PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2015, 42(10): 926~934
www.pibb.ac.cn

骨骼肌细胞中 UBXD8 的敲除及其对脂质代谢的影响

邹 飞[1)*] 刁志清[2)*] 张红超[5)] 徐式孟[3)] 刘平生[3)] 梁 斌[4)**] 魏 璇[5)**]

([1)] 安徽医科大学研究生学院，合肥 230032；[2)] 安徽大学生命科学学院，合肥 230039；
[3)] 中国科学院生物物理研究所，生物大分子国家重点实验室，北京 100101；
[4)] 中国科学院昆明动物研究所，中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，昆明 650223；
[5)] 中国人民解放军空军总医院，北京 100142)

摘要 UBXD8 是能与 p97/VCP 相互作用共同参与内质网相关的泛素化后蛋白质降解过程的膜蛋白．新近的脂滴蛋白质组学研究表明 UBXD8 能够定位到脂滴上，同时有研究表明 UBXD8 调控甘油三酯的代谢．但是 UBXD8 调控甘油三酯代谢的分子机制并不清楚．因此我们采用改良的 CRISPR/Cas9 技术敲除小鼠成骨骼肌细胞 C2C12 中的 UBXD8．从筛选出来的 26 个可能的 UBXD8 敲除单克隆细胞系中鉴定获得了 2 个确切的 UBXD8 敲除单克隆细胞系．研究表明，敲除 UBXD8 没有显著改变脂滴上蛋白质的分布，但敲除 UBXD8 增加了细胞内中性脂的累积．同时敲除 UBXD8 可缓解棕榈酸引起的胰岛素抵抗和抵抗棕榈酸引起的细胞凋亡．当在敲除 UBXD8 的细胞中重新过表达 UBXD8 后，细胞再次出现了棕榈酸引起的胰岛素抵抗及细胞凋亡．这些数据表明 UBXD8 在细胞脂质代谢及其异常所引起的胰岛素信号和细胞凋亡中起着十分重要的作用．

关键词 UBXD8，脂滴，CRISPR/Cas9，脂质代谢
学科分类号 Q2 **DOI**: 10.16476/j.pibb.2015.0147

UBXD8(ubiquitin regulatory X domain-containing protein 8)，亦称 ETEA 或 FAF2 (Fas associated factor 2)，是一个含有 UBX (ubiquitin regulatory X) 结构域的膜蛋白．UBXD8 最初发现在特应性皮炎 (atopic dermatitis) 患者的外周血 CD3 阳性细胞和嗜酸性粒细胞中高表达，但是 UBXD8 在特应性皮炎这一疾病的发生发展过程中所起的作用并没有被阐明[1]．在哺乳动物中共有 13 个含 UBX 结构域的蛋白，根据这些含 UBX 结构蛋白自身结构域组成的不同，可以将它们分成两类：一类是同时含 UBX 和 UBA (ubiquitin-associated domain)结构域的蛋白；另一类是只含 UBX 结构域的蛋白[2]．对 UBXD8 的氨基酸序列分析发现，UBXD8 含有 4 个结构域，从 N 端开始依次是 UBA 结构域、疏水结构域(HP 结构域)、UAS(ubiquitin-associating domain)结构域和 UBX 结构域，因此 UBXD8 属于含 UBX-UBA 结构域蛋白[3]．UBXD8 与内质网 (endoplasmic reticulum，ER)膜蛋白 UBAC2 共定位在内质网膜上，在受到油酸刺激后，UBXD8 转移到脂滴上[4]．脂滴蛋白质组学分析表明，UBXD8 是一个脂滴蛋白[5-6]．

2010 年，Lee 等[7-8]研究表明 UBXD8 是细胞内不饱和脂肪酸的一个感受器．当细胞培养液中缺乏脂肪酸时，E3 泛素连接酶 gp78 将 insig-1泛素化，泛素化的 insig-1 募集 UBXD8/p97 复合物并与之结合，而 p97 通过水解 ATP 将 insig-1 从 ER 膜上分离下来进入细胞质中，泛素化的 insig-1 在细胞质中被 26S 蛋白酶体降解，这一过程被称作 ER 结合蛋白降解途径 (ER-associated protein degradation, ERAD)．Insig-1 的降解释放了 Scap，Scap 将 SREBP-1 前体转运到高尔基体，SREBP-1 前体在

* 共同第一作者.
** 通讯联系人.
梁 斌. Tel: 0871-65181927, E-mail: liangb@mail.kiz.ac.cn
魏 璇. Tel: 010-66928171, E-mail: weixuangbbf@sina.com
收稿日期：2015-05-14，接受日期：2015-08-17

高尔基体中被酶解激活释放出有活性的 N 端片段，该活性片段进入细胞核激活脂肪酸合成基因的转录表达．同时，敲低 UBXD8 可使细胞在缺乏脂肪酸的条件下抑制 DAG 向 TAG 的转变从而抑制 TAG 的合成[7]．当向细胞培养液中加入不饱和脂肪酸时，UBXD8 多聚化失活，insig-1 虽然仍被泛素化但不被蛋白酶体降解，因此 insig-1 仍与 Scap 结合而抑制 SREBP-1 的酶解活化．另有研究报道，过表达 UBXD8 可明显增大 LD 的大小和数量，其可能的机制是转移到脂滴上的 UBXD8/p97 复合物将 ATGL 从 ATGL/CGI-58 复合物中解离下来从而抑制了 ATGL 的活性，最终抑制了细胞中 TAG 的水解[4]．这一结果与 Lee 等[7]的结果不一致．此外 UBXD8 参与了Ⅰ型组织相容性复合物重链[9]、神经纤维瘤蛋白 (neurofibromin) [10]、mRNP [11]、Apo100[12]的降解或调控．

本研究采用的 CRISPR/Cas9 属于Ⅱ型 CRISPR/Cas 系统．CRISPR/Cas 系统广泛存在于细菌和古细菌中，是细菌抵御外源遗传物质入侵的获得性免疫系统[13-15]．CRISPR/Cas9 由于其操作简单、成本低、突变效率高[16]，因而已被广泛应用于真核细胞的基因敲除和基因组编辑[17-18]．其基本原理是，Cas9 在指导 RNA (single guide RNA，sgRNA) 的引导下，以碱基互补配对的形式结合到靶序列上，Cas9 的核酸酶活性将靶双链 DNA 切开，产生双链断裂 (double strand break，DBS)，随后细胞启动非同源末端连接 (non-homologous end joining，NHEJ) DNA 损伤修复机制，最终导致碱基的缺失和插入，从而实现基因敲除[17-19]．

骨骼肌是人体重要的运动和代谢器官，它吸收了血液循环中约 80%的葡萄糖[20-21]．骨骼肌所吸收的葡萄糖除部分用于氧化供能和合成肌糖原外，大部分转化为脂质储存于骨骼肌细胞的脂滴中．骨骼肌细胞中脂质代谢紊乱，主要表现为脂滴稳态的异常，会引起骨骼肌胰岛素抵抗，进而发展为Ⅱ型糖尿病[22-24]．因此我们选用骨骼肌成肌细胞 C2C12 作为研究载体来研究脂滴蛋白 UBXD8 对骨骼肌脂质代谢的影响，以进一步阐明骨骼肌脂质代谢的分子机制及糖尿病的致病机理．

综上，在本研究中，我们运用改良的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术[17]在小鼠骨骼肌成肌细胞 C2C12 中敲除 UBXD8，首次获得 $C2C12^{UBXD8-/-}$ 细胞系．为了进一步阐明 UBXD8 敲除后对 C2C12 细胞脂质代谢的影响，设计了一系列的实验以探讨 UBXD8 的功能．实验数据表明，敲除 UBXD8 后没有明显引起脂滴上蛋白的变化但增加了细胞内中性脂的积累，同时可以对抗 PA 引起的胰岛素抵抗和细胞凋亡．

1　材料与方法

1.1　材料

小鼠骨骼肌成肌细胞 C2C12 购自 ATCC 公司；大肠杆菌 TOP10 购自天根公司；DMEM，青 - 链霉素以及胰蛋白酶购自迈晨科技公司；胎牛血清购自 Hyclone 公司．Cas9 敲除质粒 pX260a 由张峰教授惠赠；限制性内切酶 *Bbs* Ⅰ购自 NEB 公司；T4 连接酶，DNA 胶回收试剂盒购自 Takara 公司；T 载体连接试剂盒购自 GenStar 公司；质粒大量提取试剂盒购自威格拉斯公司；棕榈酸钠和油酸钠购自 Sigma 公司；PARP、p-AKT、AKT、ATGL、p-PERK 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司；Bip 抗体购自 BD 公司；UBXD8 抗体购自 Proteintech 公司；ADRP 抗体购自 Abcam 公司；CGI-58 购自 Abclonal 公司；Myc 抗体购自 Cell Signaling 公司；GAPDH 抗体购自 Millipore 公司；辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔及山羊抗小鼠二抗购自中杉金桥公司．ECL 曝光底物购自 Perkin Elmer 公司．质粒测序分析由擎科生物公司完成．其他试剂均为国产分析纯．

1.2　质粒构建

根据 http://www.genome-engineering.org 网站靶序列筛选设计原则分析，结合小鼠 UBXD8 的基因序列，在 UBXD8 基因上游约 1/3 处的 UBA 结构域附近选择一条特异性靶序列，设计并合成 Cas9 敲除引物，然后按 Cas9 引物退火程序使 Cas9 的正反向引物形成双链 DNA，退火后的 Cas9 引物与已经过 *Bbs* Ⅰ 酶切的 pX260 载体进行 T4 DNA 连接酶酶连反应，连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，挑取单克隆菌落测序，选取酶连正确的 pX260a-UBXD8 克隆菌，进行扩大培养并提取 pX260a-UBXD8 质粒用于电转．

UBXD8 CRISPR/Cas9 敲除引物序列：正向引物，5′ CACCGTTAACCTGTAGGGGCCGAGC 3′；反向引物，5′ AAACGCTCGGCCCCTACAGGTTA-AC 3′．

为了验证 UBXD8 KO 的表型确实是由 UBXD KO 引起的，将经过 PCR 定点突变的、可抵抗 Cas9 蛋白核酸酶活性的 UBXD8(UBXD8 Mut) 回转

到 UBXD8 KO 4 细胞中．pQCXIP-UBXD8 Mut 质粒设计过程如下，以之前设计的 pCDNA3.1-UBXD8-Myc/His 质粒为模板，PCR 扩增出 UBXD8-Myc/His 片段，然后将该片段与 pQCXIP 质粒连接，连接产物转化 TOP10 大肠杆菌感受态细胞，获得含 pQCXIP-UBXD8-Myc/His 质粒的阳性大肠杆菌克隆．将 pQCXIP-UBXD8-Myc/His 大肠杆菌扩大培养后大提获得 pQCXIP-UBXD8-Myc/His 质粒，以 pQCXIP-UBXD8-Myc/His 质粒为模板，设计特异的引物，用 Transtart FastPfu DNA 聚合酶对质粒进行环状 PCR，扩增得到已经定点突变的 pQCXIP-UBXD8 Mut-Myc/His 质粒，用该质粒转化 TOP10 大肠杆菌感受态细胞，筛选得到正确的阳性克隆，再扩大培养并质粒获得一定量 pQCXIP-UBXD8 Mut-Myc/His 质粒，用该质粒电转 UBXD8 KO 4 细胞，检测细胞由 PA 引起的胰岛素抵抗和细胞凋亡情况．

从 pCDNA3.1-UBXD8-Myc/His 质粒上扩增 UBXD8-Myc/His 片段的引物序列：正向引物，5′ ATTTAATTAAGCCACCATGGCGGCGCCTGA-GGAGCA 3′；反向引物，5′ TAGGATCCTCAGC-GGGTTTAAACTCAAT 3′．对 pQCXIP-UBXD8-Myc/His 质粒进行环状 PCR 获得 pQCXIP-UBXD8 Mut-Myc/His 质粒的引物序列：正向引物，5′ GC-CAGCAAGGCCATTGCAGGTTAAT 3′；反向引物，5′ CAATGGCCTTGCTGGCGGTGGATTG 3′．

1.3 转染及筛选

将密度长至约 80%的野生型 C2C12 细胞用胰蛋白酶消化下来，1 000 r/min 离心沉淀细胞后，用适量的电转缓冲液(88 mmol/L KH_2PO_4，11.3 mmol/L $NaHCO_3$, 2.2 mmol/L葡萄糖, 7.25 mmol/L ATP•2Na, 11.8 mmol/L $MgCl_2$• $6H_2O$) 重悬细胞，然后用血球计数板计数后，取约 10^7 个 C2C12 细胞放于电转杯中，再加入 5 μg 测序正确的 pX260a-UBXD8 敲除质粒，选用 Amaxa Nucleofector 电转仪中的 B-032 程序进行质粒电转．电转结束后的细胞重新接种于 10 cm 培养皿中，48 h 后换用含终浓度为 1 mg/L 的嘌呤霉素细胞培养液筛选细胞．约 15 天后将存活的细胞按密度梯度稀释法接种于 96 孔板，约 2 周后挑取 96 孔板中单克隆细胞群落扩大培养并鉴定．

1.4 细胞 DNA 提取、PCR 扩增及 UBXD8 敲除细胞的测序鉴定

取一定量 UBXD8 敲除细胞，用生理盐水润洗一遍后室温低速离心 5 min，弃去上清后加入 100 μl 细胞裂解液 (67 mmol/L Tris-Cl, 16.6 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 5 mmol/L 巯基乙醇，6.7 mmol/L $MgCl_2$, 6.7 mmol/L EDTA (pH8.0)，1.7 mmol/L SDS，50 mg/L 蛋白酶 K)，37℃裂解 1 h 后置于 95℃金属浴上变性 20 min．此裂解液即可作为 PCR 反应的 DNA 模板扩增 UBXD8 突变区，将 PCR 产物连接至 T 载体中并转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，挑取单克隆菌落测序，用 Clustal X2 软件对测序结果进行比对以鉴定 UBXD8 敲除细胞的基因型．

UBXD8 CRISPR/Cas9 敲除后测序验证引物序列：正向引物，5′ GGGAGACTTCCCATTACCCC-AC 3′；反向引物，5′ GCTGCTCAAAATGAGGC-CCA 3′．

1.5 细胞培养

将 C2C12 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，同时添加终浓度 100 U/ml 青霉素和 0.1 g/L 链霉素，置于 37℃，5% CO_2 饱和湿度条件下培养．在纯化 C2C12 细胞脂滴前，用 200 μmol/L 的油酸钠 (oleate acid，OA) 预处理细胞 12 h．

1.6 C2C12 细胞脂滴纯化

脂滴纯化参照 Ding 等[25]的方法：C2C12 细胞用油酸钠处理 12 h 后，将细胞刮下置于含有 200 μmol/L PMSF 的缓冲液 A(buffer A)中(25 mmol/L tricine pH 7.6，250 mmol/L 蔗糖)， 离心收集细胞并用适量的 buffer A 重悬细胞，放置冰上 15 min．氮泵破碎细胞(500 psi，冰上 15 min)后离心 (3 000 g, 10 min) 获得去核上清 (postnuclear supernatant，PNS)．先将约 8 ml 的 PNS 放于 SW40 管底部，然后再铺上约 4 ml 的缓冲液 B(buffer B)(20 mmol/L HEPES pH 7.4, 100 mmol/L KCl，2 mmol/L $MgCl_2$)，38 000 r/min，4℃ 离心 1 h．收集脂滴至新的 1.5 ml 离心管中，20 000 g 离心 5 min，小心移除底部的 buffer B，再加 200 μl buffer B，20 000 g 离心 5 min，小心移除底部的 buffer B，如此重复洗涤脂滴 3 次直至得到纯净的脂滴．

1.7 银染

固定：电泳结束后，将胶块完整取出，去离子水润洗 1 次，加入 100 ml 固定液，室温条件下放于摇床上固定 30 min．固定液配方为：无水乙醇 40 ml、乙酸 10 ml、去离子水 50 ml，摇晃混匀．

致敏：去除固定液，加入 100 ml 致敏液，放于摇床上致敏 30 min．致敏液配方为：五水合硫代

硫酸钠 0.314 g、三水合乙酸钠 11.28 g、无水乙醇 30 ml 以及去离子水 70 ml，放于磁力搅拌器上搅拌溶解混匀.

水洗：去除致敏液，用去离子水润洗 4 次，每次 5min.

银染：加入 100 ml 银染液，放于摇床上银染 20 min．银染液配方为：硝酸银 0.25 g、37%甲醛 40 μl，加去离子水至 100 ml.

显色：弃去银染液，用去离子水润洗 1 次，加显色液显色．显色液配方如下：5 g 碳酸钠、40 μl 37% 甲醛(现加)，去离子水定容至 200 ml.

终止：显色至合适程度加入终止液终止显色反应．终止液配方如下：1.96 g EDTA，去离子水定容至 100 ml.

1.8　用激光共聚焦扫描显微镜观察脂滴

向放有盖玻片的 12 孔板中加入 1 ml 培养基，加入适量的细胞，使细胞密度保持在 30% 左右，24 h 后换成含有脂肪酸的培养基 (500 μmol/L棕榈酸钠，200 μmol/L 油酸钠) 继续孵育 12 h．将盖玻片取出后用预冷的 PBS 润洗 3 次，4% 多聚甲醛室温固定 30 min，然后弃去 4% 多聚甲醛溶液，再次用 PBS 润洗 3 次，LipidTox 和 Hoechst 染色液用 PBS 按 1∶1 000 的比例配制，室温避光染色 30 min，润洗 3 遍．在载玻片上滴加 1～2 μl 抗荧光衰减剂，将细胞面液体吸干，扣在载玻片上，用指甲油封片，然后放于 Olympus FV1000 激光共聚焦扫描显微镜下观察脂滴形态及其分布.

1.9　免疫印迹

12 孔板中的细胞经处理后，用 PBS 润洗 2 遍，加入 200 μl 2 × SDS 缓冲液，室温裂解 5 min，然后 200W 超声功率超声 18 s 后在 95℃ 金属浴变性 5 min，冷却后高速离心取上清进行蛋白质电泳．蛋白样品经 10% SDS-PAGE 进行分离后，以恒流模式(200 mA、2 h)，将蛋白质电转至 PVDF 膜上，电转结束后，印迹膜用 TBST 润洗 2 次，放于含 5% 脱脂奶粉的封闭液中室温封闭 1 h，然后加入一抗，在室温中孵育 1 h (或者 4℃ 缓慢摇动孵育过夜)，用洗涤缓冲液(washing buffer)洗膜 3 次，每次 5 min；放于二抗稀释液中于室温中孵育 1 h(二抗稀释液中辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠或山羊抗兔第二抗体的浓度为 80～160 mg/L)，washing buffer 洗膜 3 次后用 ECL 压片显影.

2　实验结果

2.1　UBXD8 Cas9 敲除引物设计及实验流程

CRISPR/Cas9 基因敲除实验需要考虑以下一些因素：细胞类型、所需试剂、实验策略、阳性克隆的鉴定以及可能的脱靶效应．因此根据小鼠 UBXD8 基因序列以及生物信息学网站(http://www.genome-engineering.org) 的分析，将 UBXD8 Cas9 敲除引物设计在 UBXD8 基因上游约 1/3 处的 UBA 结构域附近 (图 1a)．将退火产物与经 *Bbs* Ⅰ 酶切后的 pX260a 载体连接、转化、挑取单克隆细胞，然后同时鉴定 UBXD8 蛋白的表达情况和 UBXD8 基因的突变情况，最终获得 UBXD8 蛋白表达阴性，遗传背景清晰的 C2C12 UBXD8 KO 单克隆细胞系(图 1b).

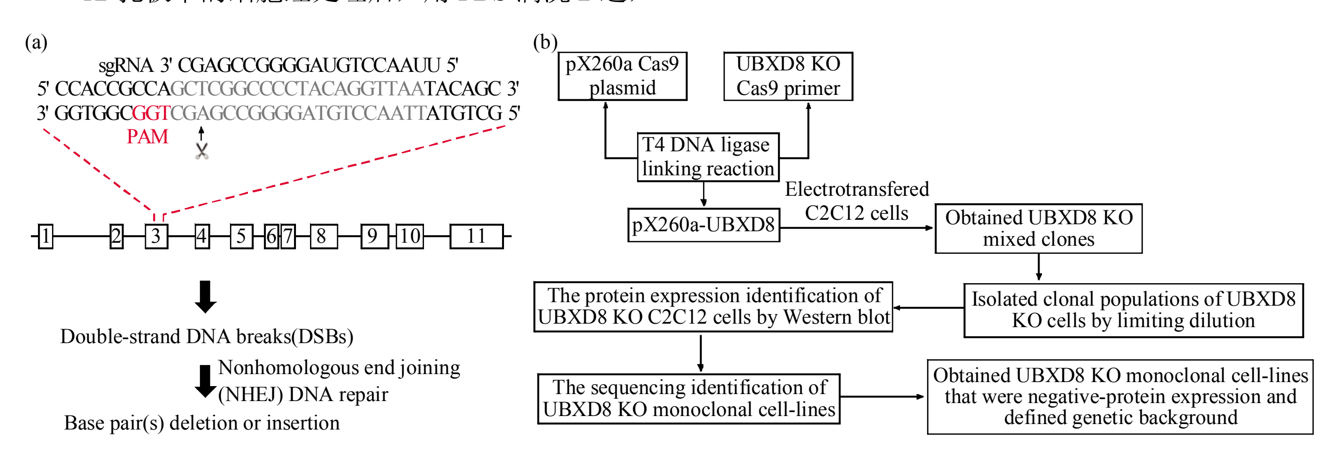


Fig. 1　Knock out UBXD8 by CRISPR/Cas9 technology in mouse C2C12 myoblasts

(a) Design the Cas9 cleavage site in the 3rd exon near the UBA domain of UBXD8. (b) The flow chart of UBXD8 KO by CRISPR/Cas9 technology.

2.2　UBXD8 敲除克隆细胞系的筛选

将测序正确的质粒提取纯化后电转 C2C12 细胞，48 h 后换用终浓度为 1 mg/L 的嘌呤霉素细胞培养液进行筛选．每 2 天换 1 次细胞培养液，2 周

后将存活下来的细胞按密度梯度稀释法接种到96孔板中筛选单克隆细胞系．2周后在显微镜下选取单克隆细胞系，共获得26个单克隆细胞系，依次编号为 *1*～*26*．通过蛋白质印迹(Western blot)检测UBXD8蛋白表达水平(图2)．检测结果显示，只有4号单克隆细胞系和26号单克隆细胞系是UBXD8蛋白表达阴性，分别命名为UBXD8 KO *4* 和UBXD8 KO *26*，其他的单克隆细胞系均能检测到UBXD8蛋白表达．此外对所有的单克隆细胞系进行全细胞DNA测序，测序结果比对表明26个单克隆细胞系的DNA序列存在不同程度的碱基缺失或插入突变(附件图S1)．

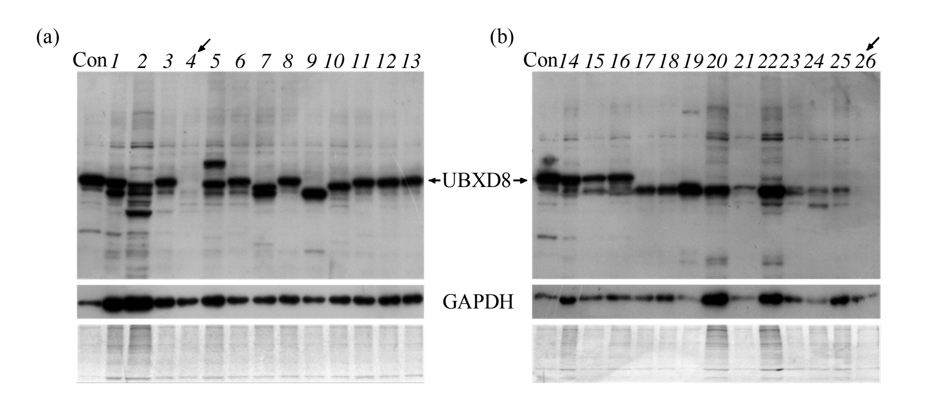


Fig. 2　The protein expression identification of UBXD8 KO C2C12 clones by Western blot

(a) The protein expression identification of UBXD8 KO *1*～*13* clones by Western blot. (b) The protein expression identification of UBXD8 KO *14*～*26* clones by Western blot. Con: Control.

2.3　UBXD8敲除单克隆细胞系UBXD8蛋白表达再确认和测序鉴定基因型

为了再次确认UBXD8是否真实敲除，我们将UBXD8 KO *4* 和UBXD8 KO *26* 与NCBI数据库中的小鼠UBXD8基因序列进行对比．免疫印迹结果显示，UBXD8 KO *4* 和UBXD8 KO *26* 均不表达UBXD8 (图3a)．DNA测序结果表明UBXD8 KO *4* 和UBXD8 KO *26* 都是杂合子，2个UBXD8同源基因序列产生了不同程度的缺失：UBXD8 KO *4* 一条染色体缺失4个碱基，另外一条染色体缺失了2

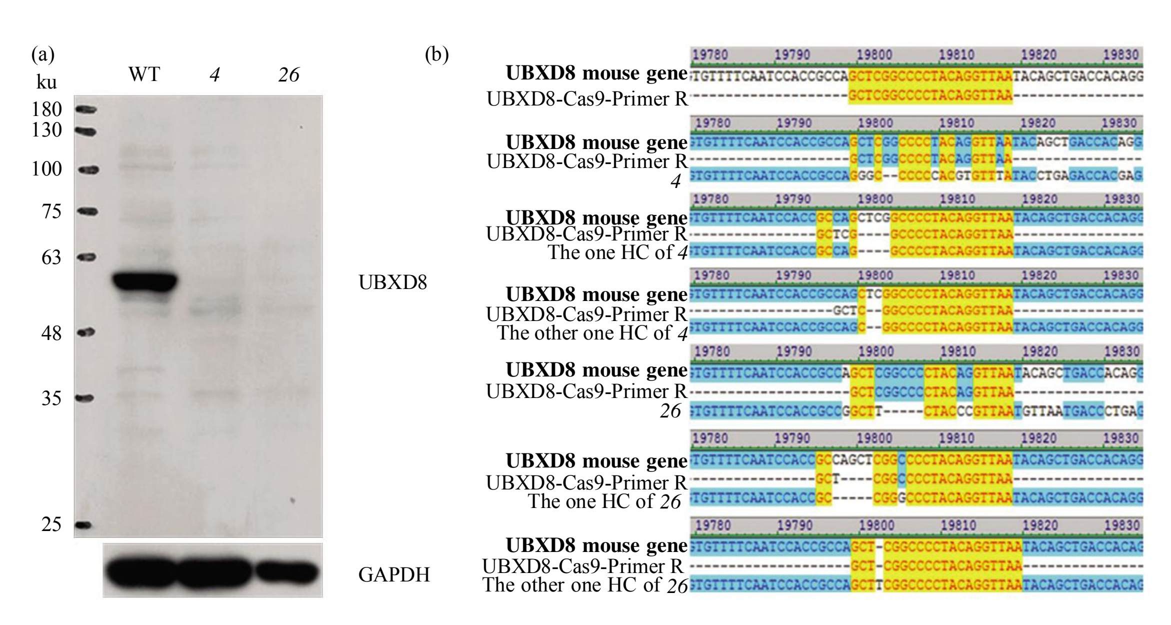


Fig. 3　Verification of UBXD8 KO clones 4 and 26 by Western blot and sequencing

(a) The Western blot verification of UBXD8 KO clones *4* and *26*. (b) The sequencing identification of UBXD8 KO clones *4* and *26*. The UBXD8 KO clone *4* cells have respectively *2* and *4* nucleotides deletion in two homologous chromosomes while the UBXD8 KO clone *26* cells have 5 nucleotides deletion and 1 nucleotide insertion respectively. WT: Wild type.

个碱基；UBXD8 KO *26* 一条染色体缺失了 5 个碱基，另外一条染色体插入了 1 个碱基 (图 3b).

2.4 敲除 UBXD8 引起细胞内中性脂的积累

UBXD8 被认为是细胞内不饱和脂肪酸的感受器，它调控细胞不同生理状态下脂肪酸和甘油三酯的代谢[7]. 为了研究 UBXD8 与脂肪酸之间的相互作用，我们对 C2C12 WT、UBXD8 KO *4* 和 UBXD8 KO *26* 细胞进行不同的脂肪酸处理 (图 4a). 实验结果表明，在不对细胞做任何处理的情况下 (Con)，C2C12 WT 细胞几乎观察不到脂滴，但 UBXD8 KO 细胞内脂滴数目增多，脂滴变大，说明 UBXD8 参与了细胞内脂质的代谢.

UBXD8 KO 导致了细胞内脂滴数目和大小的变化，因此 UBXD8 KO 可能会影响细胞内脂滴蛋白质的表达和分布. 为了验证这个假设，我们提取细胞内的脂滴并通过 SDD-PAGE 银染观察脂滴蛋白质表达和分布的差异. 银染结果表明，与 C2C12 WT 细胞脂滴蛋白相比，UBXD8 KO 细胞脂滴蛋白并没有发生显著的变化(图 4b). 说明 UBXD8 可能并不影响脂滴蛋白的表达和分布，需要分辨精度更高的蛋白质质谱实验来进一步验证.

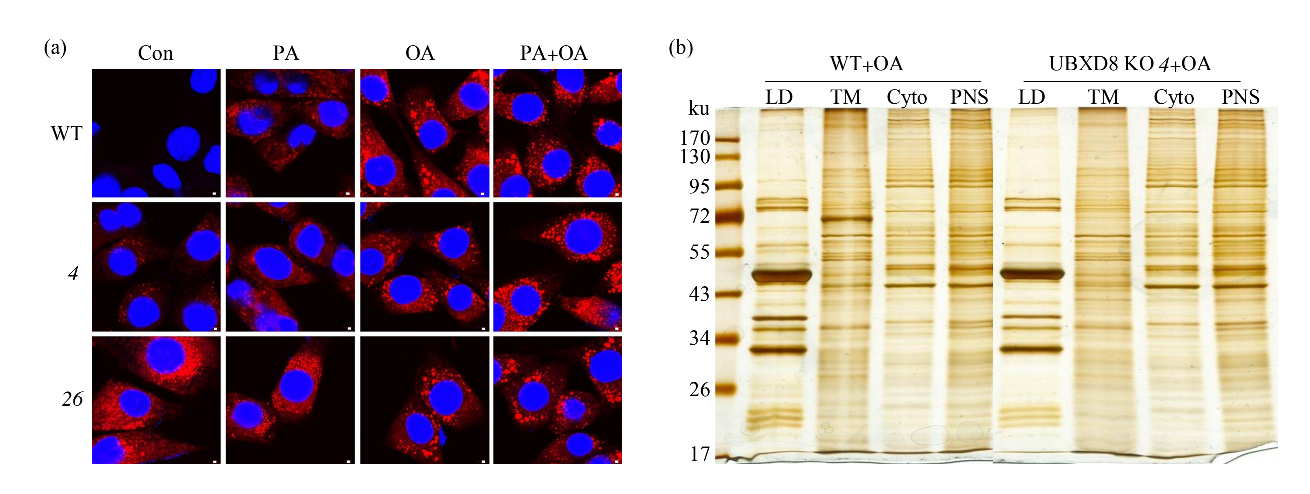


Fig. 4　UBXD8 KO lead to the accumulation of neutral lipid but did not significantly affected lipid droplet proteins expression pattern

(a) C2C12 cells (WT, UBXD8 KO *4* and *26*) grown on coverslips were stained with LipidTox Red (lipid droplets) and Hoechst (nucleus) after incubated with the fatty acids (Con; 500 μmo/L PA; 200 μmo/L OA; 500 μmo/L PA plus 200 μmo/L OA) for 12 h. Bar, 5 μm. (b) Isolated LDs from C2C12 cells (WT, UBXD8 KO *4*) after treated with OA (200 μmo/L) for 12 h. Then LD proteins were loaded and seprated by 10% SDS-PAGE along with equal amount proteins from postnuclear supernatants (PNS), cytosol (Cyto) and total member (TM). Silver stained gel was used to compare the protein profiles of different fractions. WT: Wild type; Con: Control.

2.5 UBXD8 参与骨骼肌细胞棕榈酸引起的胰岛素抵抗和细胞凋亡的调控

之前的研究结果证实棕榈酸(palmitic acid, PA)可引起 C2C12 细胞产生胰岛素抵抗，而油酸可阻断 PA 引起的胰岛素抵抗[26]. 因此我们推测 UBXD8 敲除后可能会缓解 PA 引起的胰岛素抵抗. 为了验证这一假设，我们用不同的脂肪酸处理细胞，然后检测相关蛋白的表达. 免疫印迹结果表明 UBXD8 敲除后可缓解 PA 引起的胰岛素抵抗 (图 5a). 此外有研究显示 UBXD8 可能参与了 T 细胞和嗜酸性粒细胞的细胞凋亡过程[1]. 我们的实验结果表明，C2C12 WT 细胞在 PA 处理情况下发生了 PARP 的活化剪接，而在 UBXD8 敲除的情况下，PA 不能引起 PARP 的活化剪接 (图 5a)，说明 UBXD8 敲除后可抵抗 PA 引起的细胞凋亡. 与此同时，也检测了在 UBXD8 敲除情况下，ADRP、TIP47、ATGL、CGI-58、ACSL1 等蛋白的表达，实验结果表明，这些蛋白的表达均没有发生显著变化 (附件图 S2).

为了更进一步证明 UBXD8 参与了 PA 引起的胰岛素抵抗和细胞凋亡的调控，我们在 UBXD8 KO 细胞中重新过表达 UBXD8 突变体 (UBXD8 Mut)，该突变体的 UBXD8 基因序列在 Cas9 靶序列处进行了氨基酸密码子的同义突变，以抵抗 UBXD8 KO *4* 细胞内 Cas9 蛋白的核酸酶活性. 实验结果表明，在 UBXD8 KO 细胞中重新过表达

UBXD8 Mut 后，PA 又可以引起细胞的胰岛素抵抗和细胞凋亡 (PARP 的剪接激活再次出现) (图 5b). 以上实验结果表明 UBXD8 参与了 PA 引起的胰岛素抵抗和细胞凋亡的调控.

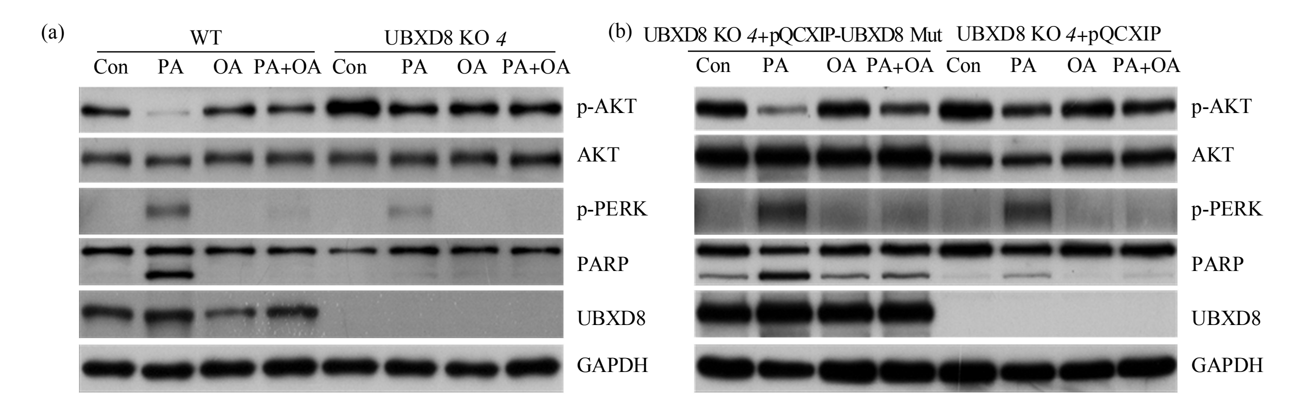


Fig. 5 UBXD8 was involved in the regulations of PA-induced insulin resistance and apoptosis

(a) WT and UBXD8 KO *4* cells were incubated with the fatty acids (Con; 500 μmol/L PA; 200 μmol/L OA; 500 μmol/L PA plus 200 μmol/L OA) for 12 h before insulin stimulation (200 nmol/L for 10 min at 37℃). After incubation, the cells were lysed in 2×SDS sample buffer and proteins were examined by immunoblot analysis. (b) Transient overexpression of UBXD8 Mut in UBXD8 KO *4* cells can result in insulin resistance and apoptosis all induced by PA again. WT: Wild type; Con: Control.

3 讨 论

骨骼肌是人体重要的运动和代谢器官，骨骼肌脂质代谢紊乱会引起胰岛素抵抗，进而发展成为糖尿病[27-28]. 骨骼肌细胞中的脂质主要以中性脂的形式储存在脂滴中[22]，脂滴上的蛋白质和相关蛋白质调控着脂滴及脂质代谢的稳态. 深入研究骨骼肌细胞的脂滴稳态，有助于阐明骨骼肌胰岛素抵抗的发生机制，为治疗糖尿病提供坚实的理论依据.

UBXD8 是一个脂滴蛋白[5-6]，属于含 UBX 结构域蛋白家族的一员. 但 UBXD8 在骨骼肌脂质代谢中的作用还未阐明，因此本研究采用新近发展起来的 CRISPR/Cas9 技术[19]，成功地敲除了骨骼成肌细胞 C2C12 中的 UBXD8，并获得了 2 株 UBXD8 敲除的细胞系，分别是 UBXD8 KO *4* 和 UBXD8 KO *26*，考虑到 UBXD8 KO *4* 细胞的形态和生长状态比 UBXD8 KO *26* 要好，因此选用 UBXD8 KO *4* 细胞系做进一步的功能分析.

研究表明，UBXD8 抑制 TAG 的合成[7]和水解[4]，敲低 UBXD8 造成的 TAG 合成的增加可能大于 TAG 的水解，最终表现为细胞中脂滴数目的增加和脂滴的变大. 因此在我们的研究中，敲除 C2C12 细胞中 UBXD8 后，C2C12 细胞中的脂滴大小和数目明显增多. 但是，细胞经 PA、OA 和 PA+OA 处理后，UBXD8 敲除细胞与对照组细胞相比，脂滴的变化不明显. 可能是大量脂肪酸对细胞脂质合成促进作用远大于 UBXD8 敲除后对脂质合成的促进作用，因此观察不到明显变化.

脂滴上分布着大量的蛋白质，这些蛋白质参与了脂滴稳态的调控[29]. 脂滴蛋白银染结果表明，敲除 UBXD8 并未引起脂滴上蛋白质的变化. 可能的原因及进一步探索的方法包括：蛋白质银染的分辨率有限，不能观察到蛋白质表达的微小变化，进一步的分析应采用 shot-gun 质谱分析法；或者 UBXD8 对互作蛋白的影响发生在翻译后水平上，如磷酸化作用，因此需要采用生化分子手段来发现这些作用.

对野生型细胞和 UBXD8 敲除细胞分别进行对照、PA、OA 和 PA+OA 处理. 敲除 C2C12 细胞中的 UBXD8 后，解除了 UBXD8 对 TAG 合成的抑制作用[7]，因此 PA 处理细胞导致合成增加的 DAG 被进一步转化为 TAG，消除了 DAG 引起的胰岛素抵抗. PA 转化合成 TAG 也消除了 PA 诱导 PARP 介导的细胞凋亡作用.

附件 图 S1、S2 见本文网络版附录(http://www.pibb.ac.cn)

参 考 文 献

[1] Imai Y, Nakada A, Hashida R, *et al.* Cloning and characterization

of the highly expressed ETEA gene from blood cells of atopic dermatitis patients. Biochem Biophys Res Commun, 2002, **297**(5): 1282−1290

[2] Alexandru G, Graumann J, Smith G T, *et al*. UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. Cell, 2008, **134**(5): 804−816

[3] Kim H, Zhang H, Meng D, *et al*. UAS domain of Ubxd8 and FAF1 polymerizes upon interaction with long-chain unsaturated fatty acids. J Lipid Res, 2013, **54**(8): 2144−2152

[4] Olzmann J A, Richter C M, Kopito R R. Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, **110**(4): 1345−1350

[5] Zehmer J K, Bartz R, Bisel B, *et al*. Targeting sequences of UBXD8 and AAM-B reveal that the ER has a direct role in the emergence and regression of lipid droplets. J Cell Sci, 2009, **122** (Pt 20): 3694−3702

[6] Zehmer J K, Bartz R, Liu, *et al*. Identification of a novel N-terminal hydrophobic sequence that targets proteins to lipid droplets. J Cell Sci, 2008, **121**(Pt 11): 1852−1860

[7] Lee J N, Kim H, Yao H, *et al*. Identification of Ubxd8 protein as a sensor for unsaturated fatty acids and regulator of triglyceride synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, **107**(50): 21424−21429

[8] Ye J. Cellular responses to unsaturated fatty acids mediated by their sensor Ubxd8. Frontiers in Biology, 2012, **7**(5): 397−403

[9] Mueller B, Klemm E J, Spooner E, *et al*. SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(34): 12325−12330

[10] Phan V T, Ding V W, Li F, *et al*. The RasGAP proteins Ira2 and neurofibromin are negatively regulated by Gpb1 in yeast and ETEA in humans. Mol Cell Biol, 2010, **30**(9): 2264−2279

[11] Zhou H L, Geng C, Luo G, *et al*. The p97-UBXD8 complex destabilizes mRNA by promoting release of ubiquitinated HuR from mRNGenes Dev, 2013, **27**(9): 1046−1058

[12] Suzuki M, Otsuka T, Ohsaki Y, *et al*. Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets. Mol Biol Cell, 2012, **23**(5): 800−810

[13] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annu Rev Genet, 2011, **45**: 273−297

[14] Terns M, Terns R M. CRISPR-based adaptive immune systems. Curr Opin Microbiol, 2011, **14**(3): 321−327

[15] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature, 2012, **482**(7385): 331−338

[16] Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering. Nat Biotechnol, 2013, **31**(3): 208−209

[17] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al*. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 2013, **339**(6121): 819−823

[18] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al*. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9. Science, 2013, **339**(6121): 823−826

[19] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 2014, **346**(6213): 1258096

[20] Thiebaud D, Jacot E, DeFronzo R A, *et al*. The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. Diabetes, 1982, **31**(11): 957−963

[21] DeFronzo R A, Ferrannini E, Sato Y, *et al*. Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. J Clin Invest, 1981, **68**(6): 1468−1474

[22] Watt M J, Hoy A J. Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, **302** (11): E1315−1328

[23] Schrauwen-Hinderling V B, Hesselink M K, Schrauwen, *et al*. Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle. Obesity (Silver Spring), 2006, **14**(3): 357−367

[24] Meex R C, Schrauwen, Hesselink M K. Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, **297**(4): R913−24

[25] Ding Y, Zhang S, Yang L, *et al*. Isolating lipid droplets from multiple species. Nat Protoc, 2013, **8**(1): 43−51

[26] Peng G, Li L, Liu Y, *et al*. Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. Endocrinology, 2011, **152**(6): 2206−2218

[27] Jacob S, Machann J, Rett K, *et al*. Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. Diabetes, 1999, **48**(5): 1113−1119

[28] Perseghin G, Scifo, De Cobelli F, *et al*. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of *in vivo* insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. Diabetes, 1999, **48**(8): 1600−1606

[29] Farese R V Jr, Walther T C. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. Cell, 2009, **139**(5): 855−860

Effect of UBXD8 Deletion on Lipid Metabolism in Skeletal Muscle Cells

ZOU Fei[1)*], DIAO Zhi-Qing[2)*], ZHANG Hong-Chao[5)], XU Shi-Meng[3)],
LIU Ping-Sheng[3)], LIANG Bin[4)**], WEI Xuan[5)**]

([1)] *Graduate School of Anhui Medical University, Hefei* 230032, China; [2)] *The School of Life Sciences of Anhui University, Hefei* 230039, China;
[3)] *National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, China;
[4)] *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Kunming* 650223, China; [5)] *General Hospital of Air Force, Beijing* 100142, China)

Abstract UBXD8 is a membrane protein that mediates endoplasmic reticulum-associated protein ubiquitination and degradation by interacting with p97/VCP. Recently, lipid droplet proteomic studies show the lipid droplet localization of UBXD8. Besides, UBXD8 is also involved in triglyceride metabolism. However, the molecular mechanism by which UBXD8 regulates triglyceride metabolism is still obscure. Here we knocked out UBXD8 in mouse C2C12 myoblasts by CRISPR/Cas9. We selected 2 UBXD8 knockout (KO) clone cell lines from 26 possible KO clones. UBXD8 KO did not change the lipid droplet proteins expression pattern. However, UBXD8 KO led to the accumulation of neutral lipid. Furthermore, our data show that UBXD8 KO could alleviate palmitate-induced insulin resistance and rescue palmitate-induced apoptosis which was characterized by PARP splicing. In addition, the phenotype of palmitate-induced insulin resistance and apoptosis was reappeared after overexpressing UBXD8 in UBXD8 KO cells. These data suggested that UBXD8 plays an important role in lipid metabolism and its abnormity related insulin signal and apoptosis.

Key words UBXD8, lipid droplet, CRISPR/Cas9, lipid metabolism
DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0147

---

*These authors contributed equally to this work.
**Corresponding author.
LIANG Bin. Tel: 86-871-65181927, E-mail: liangb@mail.kiz.ac.cn
WEI Xuan. Tel: 86-10- 66928171, E-mail: weixuangbbf@sina.com
Received: May 14, 2015 Accepted: August 17, 2015

附　　录

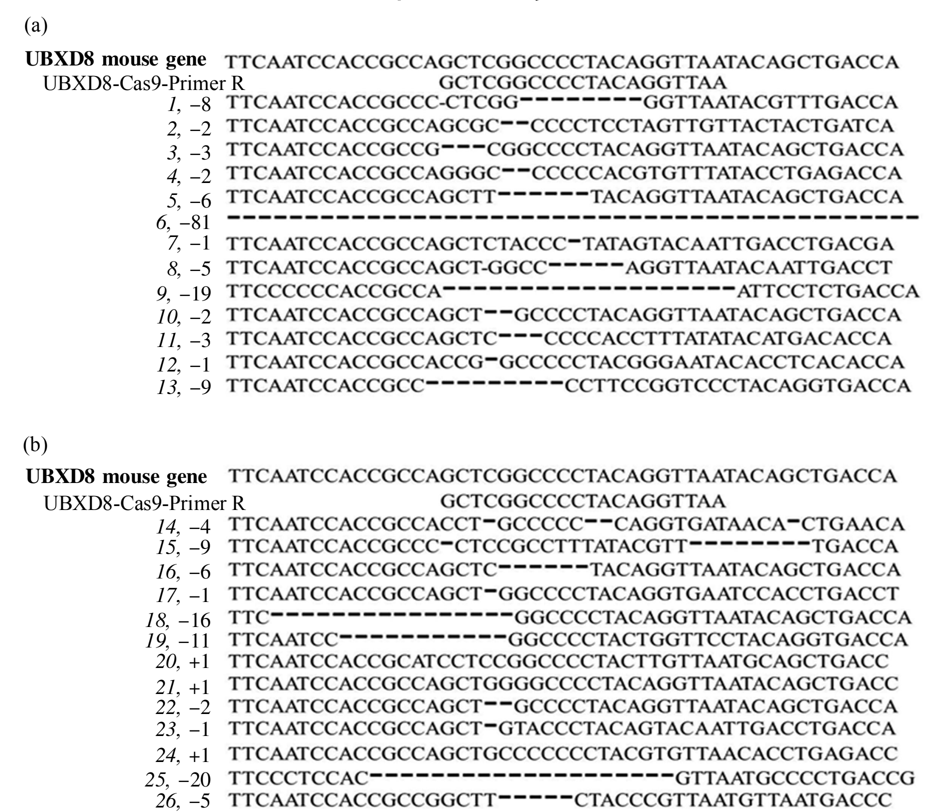


Fig. S1　Sequencing results of UBXD8 KO monoclones

(a) Detailed sequencing results of UBXD8 KO monoclones *1*～*13*. (b) Detailed sequencing results of UBXD8 KO monoclones *14*～*26*. (−) or (+) represent the amount of deleted or inserted base pairs.

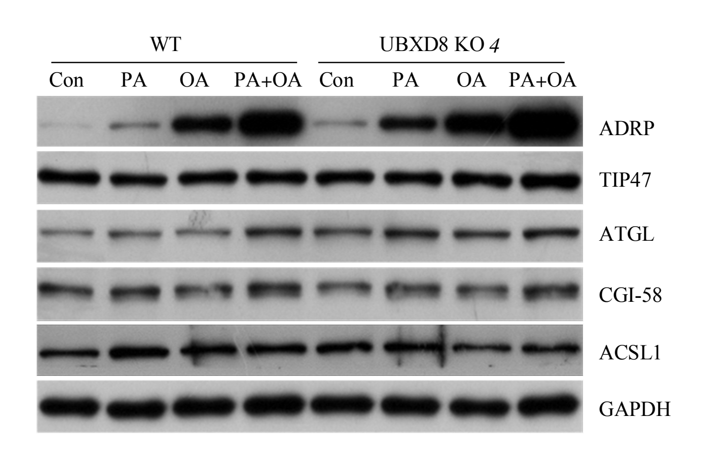


Fig. S1　The comparison of lipid droplet-associated proteins

WT and Clone *4* cells were treated with the fatty acids (Con; 500 μmol/L PA; 200 μmol/L OA; 500 μmol/L PA plus 200 μmol/L OA) for 12 h before insulin stimulation (200 nmol/L for 10 min at 37℃). After incubation, the cells were lysed in 2×SDS sample buffer and proteins were examined by immunoblot analysis. WT: Wild type; Con: Control.